

Натурсидин / Naturcidin

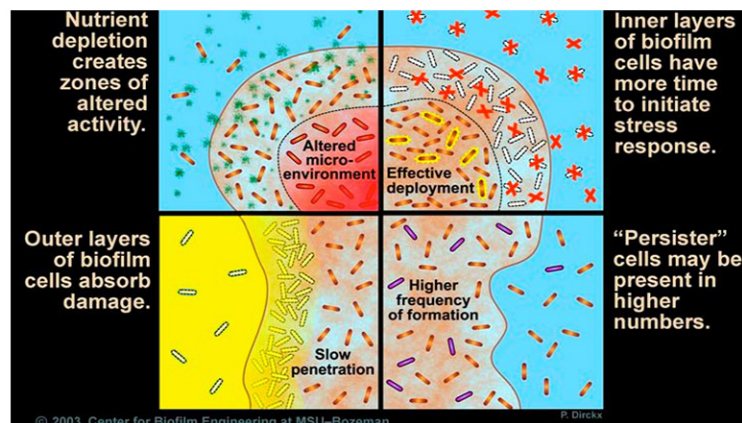
Клаудиа Маркес, Доктор философии
Университет Бингемтона (США), Отделение биологии

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ ОТЧЕТ ПО ИЗУЧЕНИЮ АКТИВНОСТИ НАТУРСИДИНА ПРОТИВ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ФОРМИРУЮЩИХ БИОПЛЕНКИ.

Цель данного исследования заключается в том, чтобы определить, является ли Натурсидин® эффективным средством против биопленок, образованных *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*.

Принято считать, что форма жизни бактерий - отдельные клетки, в этой связи тесты на чувствительность, применяемые в настоящее время в диагностических лабораториях, нацелены, преимущественно, на такие одиночные клетки. Однако в естественной среде обитания бактерии представляют собой не разрозненные клетки, а сообщества, способные контактировать друг с другом посредством химических сигнальных молекул. Такие сообщества бактерий обычно называют биопленками. Биопленки обнаруживаются в 80% случаев при развитии инфекционных заболеваний, и, в том числе, при большинстве хронических инфекций. Биопленки - это сложные, динамические структуры, реагирующие на стимулы скоординированными внутренними реакциями, которые обеспечивают межклеточными и внутриклеточными взаимодействиями. Биопленки в 10-1000 раз менее восприимчивы к антибактериальным препаратам, чем микроорганизмы соответствующих видов, живущие в планктоне (1). Однако, когда бактерии выходят из состава биопленки, чувствительность к антибиотикам восстанавливается (2). Повышенную устойчивость биопленок к антибактериальным препаратам связывают с несколькими факторами (Рис. 1), включая следующие:

- А. Наличие экстраполимерного вещества (EPS), действующего как защитный барьер и препятствующего проникновению антибактериальных препаратов, при определенных обстоятельствах способного их инактивировать (3).
- В. Образование гетерогенной клеточной популяции, для клеток которой характерна разная скорость роста (4).
- С. Фенотип биопленки, субпопуляция сообщества клеток, обладающая активными механизмами, действие которых проявляется в нейтрализации вредных для клеток воздействий антибактериальных препаратов (5).
- Д. Наличие устойчивых клеток (толерантной популяции), которые могут избежать уничтожения, так как в присутствии антибиотиков не происходит их роста или гибели, кроме того, у них не формируется ответной реакции на воздействие антибактериального препарата. Это специализированные клетки, функция которых заключается в выживании, а их образование зависит от стадии роста популяции, как в открытых, так и в закрытых системах (6).

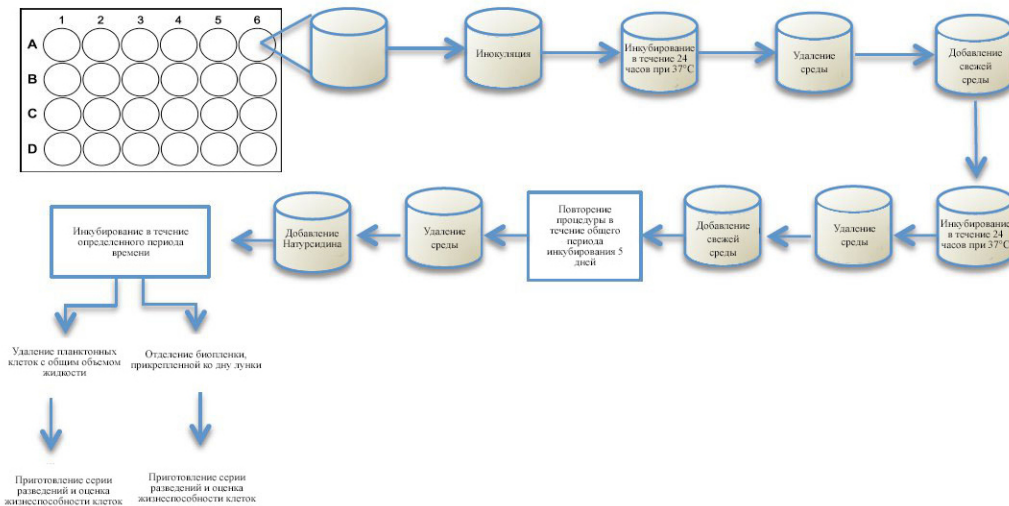


С учетом устойчивости биопленки и неспособности антимикробных препаратов, применяемых в настоящее время, остановить развитие инфекций, Натурсидин® можно рассматривать как эффективную альтернативу при борьбе с биопленочной инфекцией.

При проверке антимикробной активности Натурсидина® мы установили его минимальные ингибирующие концентрации (MIC) против клеток в планктоне:

	Минимальная ингибирующая концентрация (MIC)	
	Среднее значение	Стандартное отклонение
<i>E. coli</i> (ATCC 11775)	6.25%	0.2%
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	12.5%	1.1%
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10752)	12.5%	0.6%
<i>K. pneumonia</i> (ATCC 49619)	12.5%	0.5%
<i>C. albicans</i> (ATCC 20260)	12.5%	0.3%

После того определения MIC для каждого изучаемого вида бактерий, было начато исследование биопленки при помощи метода, разработанного в нашей лаборатории.



Было проведено определение эффективности препарата Натурсидин® против биопленки. Были протестированы разные концентрации Натурсидина® при разведении в растворе соли (0.85% хлорида натрия), затем была проведена оценка жизнеспособности клеток. В целом, биопленки были менее восприимчивы к препарату, чем клетки, содержащиеся в растворе в свободном состоянии (планктон). Этот результат был ожидаемым, так как после отделения клеток от биопленки и свободного распределения в жидкости, их восприимчивость к антибактериальным препаратам увеличивается.

Таблица 2. % Гибель клеток после воздействия разных концентраций Натурсидина® в течение 4 часов при 37°C в условиях аэрации.

		Натурсидин® 0%	Натурсидин® 25%	Натурсидин® 50%	Натурсидин® 75%	
<i>S. aureus</i>	Биопленки	0%	92.9%	88.4%	95.3%	89.7%
	Планктон	0%	99.2%	60.0%	91.9%	99.9%
<i>K. pneumonia</i>	Биопленки	0%	90.7%	78%	82.7%	99.8%
	Планктон	0%	99.1%	55.9%	91%	99.97%
<i>P. aeruginosa</i>	Биопленки	0%	92.1%	99.99%	99.96%	N/A
	Планктон	0%	93.3%	99.99%	99.97%	N/A
<i>C. albicans</i>	Биопленки	0%	99.96%	99.99%	99.98%	99.99%
	Планктон	0%	95.6%	96.3%	95.9%	99.7%

Следовательно, биопленки подвергались воздействию определенной концентрации Натурсидина® в течение 24 часов, при этом проводился мониторинг жизнеспособности клеток.

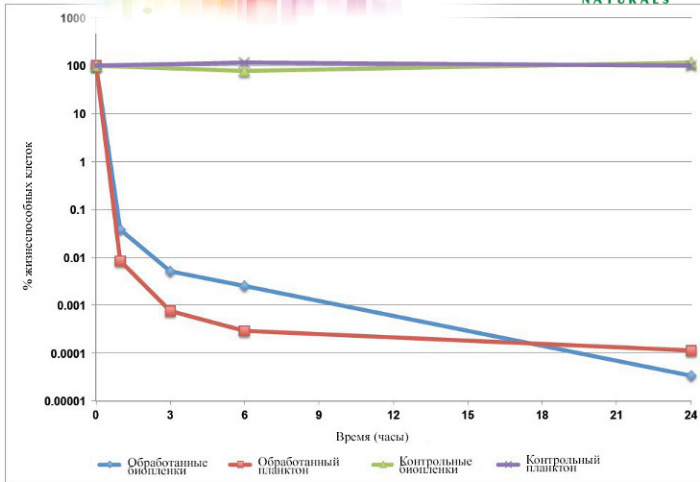


Рисунок 1. Биопленки *P. aeruginosa* подверглись воздействию 50% Натурсидина® в течение 24 часов. После инкубирования в течение 24 часов большая часть клеток биопленки и планктонной популяции была уничтожена.

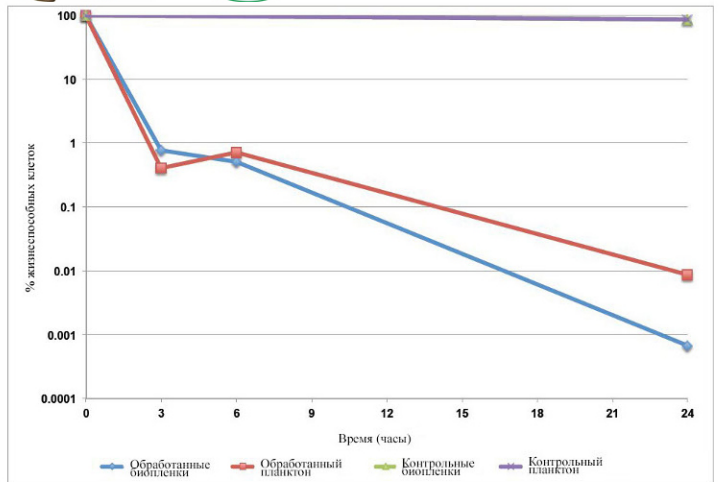


Рисунок 2. Биопленки *E. coli* находились под воздействием 50% Натурсидина® в течение 24 часов. После инкубирования в течение 24 часов большая часть клеток биопленки и планктонной популяции была уничтожена.

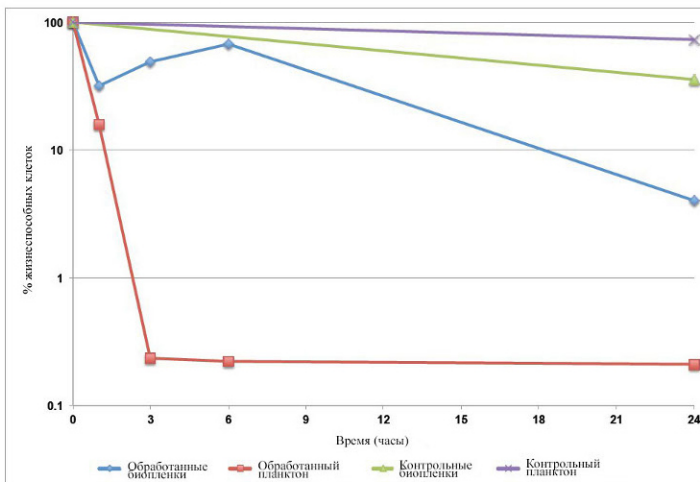


Рисунок 3. Биопленки *K. pneumoniae* находились под воздействием 25% Натурсидина® в течение 24 часов.

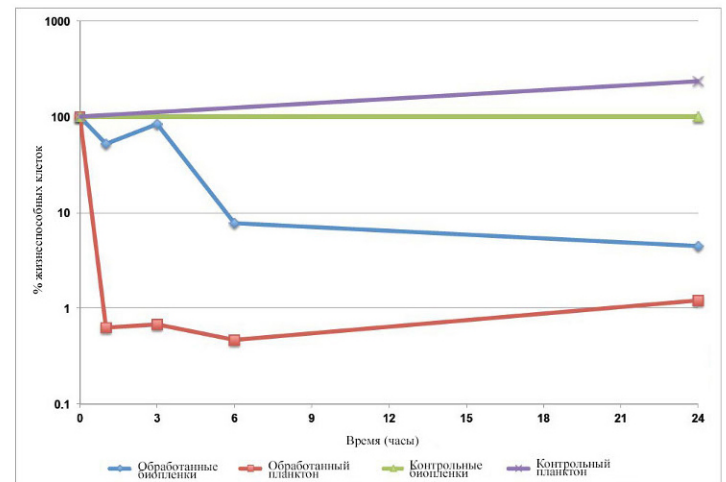


Рисунок 5. *S. albicans* биопленки находилась под воздействием 25% Натурсидина® в течение 24 часов.

Биопленки *S. albicans* также находилась под воздействием Натурсидина®, но в концентрации 25%, а не 50%, в течение 24 ч. Однако вместо простого мониторинга жизнеспособности клеток на чашках с агаром (Рис. 5), мною был использован краситель, выявляющий живые/мертвые клетки (Инвитроджен), а контроль эффективности Натурсидина® проводился при помощи конфокальной микроскопии. Снимки были сделаны при пятикратном увеличении изображения при 200x конфокального сканирующего лазерного микроскопа (Рис. 4). Кроме того, мною был проведен анализ снимков при помощи программного обеспечения изображений COMSTAT (Таблица 3) и Luminance Analyzer v1.0 (разработанных в Университете Бингемтона) (Рис. 6) для измерения интенсивности флуоресценции.

Жизнеспособность клеток уменьшилась на >99% в планктонной популяции, и на >90% в биопленке (Рис. 5). Было отмечено значительное уменьшение толщины биопленки, общей биомассы и поверхностной площади, занятой биомассой (Таблица 3). Воздействие Натурсидина® приводило к уменьшению количества живых клеток или неповрежденных мембран до 50%, от количества исходно живых окрашенных клеток, составлявших 80% популяции (Рис. 6).

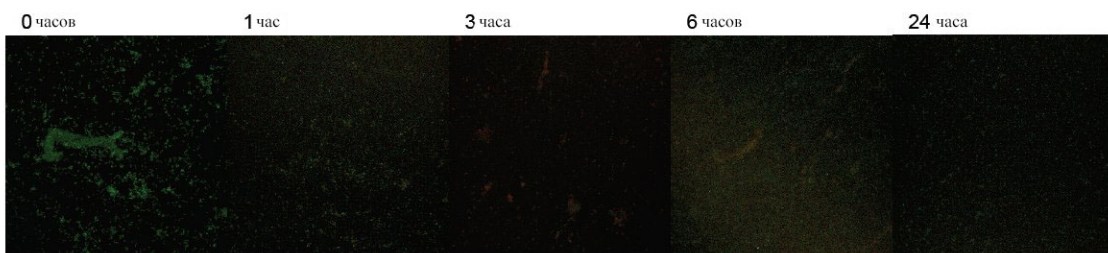


Рисунок 4. Биопленка *S. albicans* находилась под воздействием 25% Натурсидина® в течение 24 часов

Таблица 3. Анализ COMSTAT снимков CSLM клеток *S. albicans*, которые находились под воздействием Натурсидина в течение 24 ч.

	0ч		1ч		3ч	
	среднее значение	стандартное отклонение	среднее значение	стандартное отклонение	среднее значение	стандартное отклонение
Общая биомасса ($\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$)	0.1794	0.0747	0.0093	0.0122	0.0127	0.0138
Доля среза, занятая бактериями (%)	1.82	1.24	0.45	0.66	0.71	0.80
Средняя толщина (μm)	0.3398	0.1125	0.0047	0.0053	0.0052	0.0048
Коэффициент неровности поверхности (размерность отсутствует, область: от нуля до бесконечности)	1.9328	0.0358	1.9973	0.0037	1.9972	0.0029
Поверхностная площадь биомассы на серии снимков этого среза (μm^2)	2.53E+05	1.16E+05	1.70E+04	2.29E+04	2.39E+04	2.62E+04
Соотношение поверхности и биологического объема ($\mu\text{m}^2 / \mu\text{m}^3$)	2.34	0.16	2.94	0.28	2.96	0.25
Максимальная толщина (μm)	33.92	7.41	12.50	4.27	15.63	2.27
	6ч		24ч		контроль 24ч	
	среднее значение	стандартное отклонение	среднее значение	стандартное отклонение	среднее значение	стандартное отклонение
Общая биомасса ($\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$)	0.0074	0.0041	0.0027	0.0019	0.4839	0.2558
Доля среза, занятая бактериями (%)	0.48	0.32	0.19	0.13	4.43	1.98
Средняя толщина (μm)	0.0013	0.0016	0.0003	0.0004	1.0053	0.5021
Коэффициент неровности поверхности (размерность отсутствует, предел: от нуля до бесконечности)	1.9991	0.0010	1.4998	0.9999	1.8313	0.0972
Поверхностная площадь биомассы на серии снимков этого среза (μm^2)	1.42E+04	8.40E+03	5.28E+03	3.73E+03	6.36E+05	4.44E+05
Соотношение поверхности и биологического объема ($\mu\text{m}^2 / \mu\text{m}^3$)	3.19	0.29	3.31	0.13	2.56	0.23
Максимальная толщина (μm)	7.98	5.21	2.01	2.25	39.79	4.20

В целом, Натурсидин® исключительно эффективен против планктонных популяций бактериальных клеток в концентрации 25% или выше. Клетки в форме биопленок более устойчивы, и необходимы более высокие концентрации Натурсидина® для достижения результатов, сопоставимых по эффективности. 90% клеток (как планктона, представляющего собой взвесь клеток в жидкости, так и биопленки) всех протестированных микроорганизмов уничтожается 25% Натурсидина после 4 ч воздействия препарата. Длительное воздействие Натурсидина® приводит к значительному снижению жизнеспособности клеток. При воздействии Натурсидина® (50%) в течение 24 ч жизнеспособность клеток *E. coli* и *P. aeruginosa* как в составе биопленок, так и планктона, уменьшается, отмечается практически полное уничтожение клеток. Кроме того, воздействие 25% Натурсидина® на *K. pneumonia* или *S. albicans* в течение 24 ч приводит к значительному снижению жизнеспособности клеток планктонной популяции, хотя полного уничтожения добиться не удается.

Следующим этапом нашего исследования будет определение эффективности препарата при более низких концентрациях в течение периода 5-7 дней.

Список литературы:

1. Brown MR, Gilbert P. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. The Journal of applied bacteriology 74 Suppl:87S–97S.
2. Stewart PS. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol 292:107–113.
3. Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol.8:623–633.
4. Wentland EJ, Stewart PS, Huang CT, McFeters GA. 1996. Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm. Biotechnology progress 12:316–21.
5. Kuchma SL, O'Toole GA. 2000. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. Curr. Opinion Biotechnol.
6. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. 2004. Persister cells and tolerance to antimicrobials. FEMS Microbiology Letters 230:13–18.